

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659815

研究課題名(和文) ヒト乳歯幹細胞を用いた造血機能再生医療へのチャレンジ

研究課題名(英文) Challenge for SHED-based Hematopoietic Regeneration

研究代表者

山座 孝義 (Yamaza, Takayoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：80304814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：乳歯幹細胞にエリスロポイエチン(EPO)受容体が発現していた。EPO(1, 10, 100 ng/ml)で刺激後30分程でStat5のリン酸化の上昇が確認された。EPOで3日間刺激したSHEDとハイドロキシアパタイト/リン酸三カルシウム結晶とを混合し、免疫不全マウスの皮下に移植した。移植8週後、EPO刺激群での骨髄ニッチ形成の増加所見が認められた。SHED移植体より細胞を回収し、免疫蛍光染色法およびフローサイトメトリー法で造血系細胞のマーカーの発現を検索し、再生骨髄での造血系幹細胞を確認した。

研究成果の概要(英文)：Erythropoietin (EPO) Receptor was expressed on stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). EPO-stimulated SHED unregulated Stat5 phosphorylation. EPO-stimulated SHED were capable of increasing the formation of hematopoietic niches compared to non-stimulated SHED when SHED were subcutaneously transplanted with hydroxyapatite carriers into immunocompromised mice. In the increase hematopoietic niche, hematopoietic cells were found by immunofluorescent and flow cytometric analyses. Taken together, these data suggested that EPO is able to induce the capacity of hematopoiesis through SHED.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：乳歯幹細胞 造血機能 再生医療 エリスロポイエチン

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植（骨髄細胞移植や臍帯血細胞移植）による骨髄組織の再構築を基盤とした再生医療は、現在では白血病や自己免疫疾患などの治療に幅広く応用され、必要不可欠な治療法として確立している。その一方、非HLAマッチングなどによる慢性的な骨髄ドナーの不足、治療課程での放射線暴露による身体の障害、移植細胞の生着率の不確かさ、永続的な免疫抑制剤の使用による副作用など治療上の問題が多いのも事実である。従って、より良い骨髄組織再生療法の開発が求められている。

ヒト骨髄間葉系幹細胞(Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; hBMMSCs)は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、神経細胞、肝細胞、インスリン産生細胞、血管内皮細胞など様々な細胞への分化能力を示す。一方、ヒドロキシアパタイトなどのキャリアーとともに成体内に移植すると、骨組織の再生と同時に骨髄組織の形成が誘導されることが知られている。近年、赤血球分化促進ホルモンであるエリスロポイエチンの受容体 (Erythropoietin Receptor; EPO-R)がhBMMSCsに発現している事、EPOで刺激した場合、細胞内シグナルStat5のリン酸化が誘導される事が示された。またエリスロポイエチン (Erythropoietin; EPO)で刺激したhBMMSCsとヒドロキシアパタイトとの混合物を免疫不全マウスに皮下移植すると、骨再生量に変化が認められなかったが、EPO刺激群で非常に多くの骨髄組織の形成が観察された。従って、EPOはhBMMSCs骨髄ニッチ形成能力を高め、hBMMSCsを介した造血作用を誘導する事が示唆され、EPOとhBMMSCsとの強調作用による骨髄再生の可能性が推測される。

ヒト乳歯幹細胞(Stem cells from Human Exfoliated Desiduous Teeth; SHED)が発見された当初、骨芽細胞、脂肪細胞、神経細胞への分化が報告され、その後、肝細胞、インスリン産生細胞、血管内皮細胞など様々な細胞への分化能力を備えている事が示めされてきた。SHEDをヒドロキシアパタイトなどのキャリアーとともに成体内に移植すると、象牙質/歯髄複合体の再生とともに、骨/骨髄ユ

ニットの形成が誘導されることが知られている。しかしながらこの再生した骨/骨髄ユニットはhBMMSCsにより再生された骨/骨髄ユニットと比較すると、非常に脆弱で矮小な組織構築を為している。しかしながら、骨髄を再生誘導する能力は微力ながら備えているために、SHEDは、骨髄再生医療の一役を担う細胞ソースの重要な候補細胞であると考えられる。

## 2. 研究の目的

正常状態において、SHEDが骨髄組織を再生誘導する骨髄ニッチ形成能力を潜在的に具備しているが、その能力はhBMMSCsと比較すると非常に脆弱なものである。従ってSHEDを骨髄再生の細胞ソースとして使用する為には骨髄ニッチ形成能を飛躍的に向上させる必要がある。

EPOがhBMMSCsの骨髄ニッチ形成能を促進することに着目し、SHEDにおける骨髄再生力に及ぼすEPOの影響を解析する事を目的とした。以下を解析目標とした。

- ①SHEDにおけるEPO-Rの発現解析とその下流シグナルの検討
  - ②EPO刺激SHED細胞を用いた免疫不全マウスにおける皮下移植実験における骨髄組織再生誘導能力の検討
  - ③再生骨髄組織の造血力の検討
  - ④再生骨髄組織由来細胞の造血能力の検討
- 以上の内容を解析することで、SHEDが骨髄再生医療の細胞ソースの候補者となりうるか検討する。

## 3. 研究の方法

### ①SHEDの単離と培養

九州大学病院小児歯科で乳歯を採取した。乳歯に残存する歯髄組織を取出し、ディスパーゼ/コラゲナーゼ混合酵素溶液で組織分解を行った。酵素処理溶液中の細胞を回収し、T-75フラスコに播種した。播種後3時間で培養フラスコをPBS洗浄し、浮遊細胞を除去した。培地培養を継続し、付着性細胞コロニーを形成させた。継代培養を行い研究に必要な細胞数を得た。単離SHEDを間葉系幹細胞と同定する為に、(1)コロニー形成能、(2)表面マ

ーカー(STRO-1, CD146, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14)のフローサイトメトリーによる解析、(3)多分化能(骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化)の組織学的、RT-PCR法、Western Blotting法による解析を行った。

#### ②SHEDにおけるEPO-Rの発現と機能の解析

SHEDにおけるEPO-R発現をフローサイトメトリー、免疫組織化学、Western Blotting法、RT-PCR法にて分析した。

さらに、EPOを無血清培地に添加し、経時的に細胞を回収した。その後Western Blotting法にてEPO-R下流シグナルの候補シグナル分子(Stat5ならびにそのリン酸化分子)をWestern Blotting法にて分析した。また、EPO-R siRNAを作用させ、候補シグナル分子の動態も解析した。

#### ③EPO刺激SHEDによる骨/骨髄ユニット形成能と骨髄機能の解析

EPOで刺激したSHEDをハイドロキシアパタイト粉末と混和し、免疫不全マウスの皮下に移植した。移植後8週目に移植体を回収し、骨/骨髄ユニットの形成を組織学的に評価した。SHEDの位置はEPO-RまたはStat5 siRNAで処理した細胞を使用した。また、一部の移植体から細胞を回収し、骨髄系細胞マーカーの解析をフローサイトメトリーにて行った。

eGFPマウスの骨髄細胞をSHED移植マウスに静脈内投与した。投与後4週目に移植体を回収し、別の免疫不全マウスに二次移植した。二次移植4週後、移植体ならびに末梢血を回収し、免疫組織化ならびにフローサイトメトリーにてeGFPの局在を評価した。

## 4. 研究成果

### ①SHED特性の解析

単離したSHEDは、付着性細胞コロニーを形成していた。フローサイトメトリーにより、STRO-1, CD146, CD73, CD105に陽性反応を示し、CD34, CD45, CD14には陰性反応を示した。骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導を行った所、組織学的解析によりそれぞれAlizarin Red陽性基質、アルシアンブ

ルー陽性基質、Oil Red陽性細胞内貯留物が確認された。またRT-PCR法ならびにWestern Blotting法により骨芽細胞特異的分子(Runx2, alkaline phosphatase, osteocalcin)、軟骨細胞特異的分子(Sox2, type II collagen)、脂肪細胞特異的分子(lipoprotein lipase, peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ )の発現もそれぞれの分化系で確認された。以上の結果から、単離した細胞は間葉系幹細胞の特性を有している事が示された。

### ②SHEDにおけるEPO-Rの発現と機能の解析

フローサイトメトリー、免疫組織化学、Western Blotting法、RT-PCR法にて、SHEDにおけるEPO-R発現を確認した。また、EPO刺激後30分でEPO-R下流シグナルStat5のリン酸化をWestern Blotting法にて認めた。このリン酸化は、EPO-R siRNAによるEPO-Rノックダウンにより減弱した。

### ③EPO刺激SHEDによる骨/骨髄ユニット形成能と骨髄機能の解析

ヘマトキシリン&エオジン染色による組織学的解析により、EPO刺激SHEDの移植体では、骨髄組織の再生が増加していた。EPO-RまたはStat5 siRNAで処理したSHEDの移植体では骨髄組織形成の増加は認められなかった。また移植体から回収した細胞をフローサイトメトリーにて解析した所、骨髄系細胞マーカー(CD45, CCD34, CD4, CD11b, Gr-1, TER-119)陽性細胞の存在が確認された。フローサイトメトリーにより、eGFPマウス骨髄細胞投与したSHED移植体を二次移植したマウスの末梢血中にeGFP陽性細胞が認められた。また二次移植体内部にもeGFP陽性細胞の局在が免疫組織学的に確認できた。

以上の研究成果から、SHEDに発現するEPO-R/Stat5を介したEPOの刺激によりSHEDが潜在性に有する骨髄ニッチ形成能を活性化でき、その再生した組織は十分に骨髄(造血)機能を備えた組織であると示された。EPOを応用する事によりSHEDも骨髄生成医療の優れた細胞ソースとなる事が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ①Lan Ma, Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Yoshihiro Hoshino, Guangtai Song, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Songtao Shi, Takayoshi Yamaza. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell source for regenerative medicine. PLoS ONE, 2012: e51777.

DOI: 10.1371/journal.pone.0051777

- ②Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Yoshihiro Hoshino, Kazuaki Nonaka, Yoshihiro Terada, Toshio Kukita, Songtao Shi, Takayoshi Yamaza. Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. J Dent Res. 2013;92:609-615

DOI: 10.1177/022034513490732

〔学会発表〕 (計 16 件)

- ①Fastima Safira Alatas, Takayoshi Yamaza, Haruyoshi Yamaza, Toshiharu Matsuura, Makoto Hayashida, Yusuke Yanagai, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Shouici Ohga, Tomoaki Taguchi. Trans-differentiation capacity into hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. 第49回日本小児外科学会総会, 口頭発表, 2012年5月14日~2012年5月16日, 横浜市、神奈川県.

- ②Lan Ma, Yusuke Makino, Haruyoshi Yamaza, Kentaro Akiyama, Yoshihiro Hoshino, Guangtai Song, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Songtao Shi, Takayoshi Yamaza. Long-term cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth utilize for a feasible stem cell source for regenerative medicine. Gordon Research Conference, Biomaterials & Tissue Engineering.ポスター発表, 2012年7月28日~2012年8月2日, Holderness, NH, USA.

- ③山座孝義. 歯髄幹細胞による免疫療法. 第54回歯科基礎医学会総会サテライトシンポジウム, 招待講演, 2012年9月14日~2012年9月16日, 郡山市、福島県.

- ④馬蘭、山座孝義、牧野友祐、山座治義、星野慶弘、増田啓太郎、久木田敏夫、野中和明. Bone regeneration using stem cells from

long-term cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth. 第54回歯科基礎医学会総会, 口頭発表, 2012年9月14日~2012年9月16日, 郡山市、福島県.

- ⑤増田啓太郎、山座孝義、馬蘭、牧野友祐、星野慶弘、樋口勝規. 歯周炎患者由来歯周靱帯幹細胞に対するエリスロポイエチンの影響. 第54回歯科基礎医学会総会, ポスター発表, 2012年9月14日~2012年9月16日, 郡山市、福島県.

- ⑥Alatas FS, Takayoshi Yamaza, Haruyoshi Yamaza, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Shouici Ohga, Tomoaki Taguchi. Trans-differentiation and spheroid formation of hepatocyte-like cells of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. 4<sup>th</sup> World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. 口頭発表, 2012年11月14日~2012年11月18日, Taipei, Taiwan.

- ⑦山座孝義. 歯髄幹細胞による免疫細胞療法. 第34回日本再生医療学会総会, シンポジウム, 招待講演, 2013年7月1日~2013年7月3日, 京都市、京都府.

- ⑧Lan Ma, Haruyoshi Yamaza, Yoshihiro Hoshino, Toshio Kukita, Kazuaki Nonaka, Takayoshi Yamaza. Cryopreservation of dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth utilize is a suitable stem cell bank for regenerative medicine. The 22th Fukuoka International Symposium on Pediatric, Maternal-Child Health Research. 招待講演, 2013年8月31日, Fukuoka, Japan.

- ⑨山座孝義. 凍結ヒト歯髄組織の臨床応用の可能性. 第55回歯科基礎医学会総会, サテライトシンポジウム, 招待講演, 2013年9月20日~2013年9月22日, 岡山市、岡山県.

- ⑩馬蘭、山座孝義、星野慶弘、山座治義、野中和明、久木田敏夫. Expression of erythropoietin receptor on stem cells from exfoliated deciduous teeth. 第55回歯科基礎医学会総会, 口頭発表, 2013年9月20日~2013年9月22日, 岡山市、岡山県.

- ⑪村田直久、五百井秀樹、大内雅博、合島玲央奈、沖雄二、山座孝義、高橋一郎、城戸瑞穂. 矯正歯の移動におけるアレルギー

誘導性歯根吸収促進機構, 第55回歯科基礎  
医学会総会, ポスター発表, 2013年9月20  
日~2013年9月22日, 岡山市, 岡山県,

⑬星野慶弘、山座孝義、馬蘭、山座治義、野  
中和明, ヒト歯髄幹細胞に対するビリルビ  
ンの影響, 第55回歯科基礎医学会総会, ポ  
スター発表, 2013年9月20日~2013年9月22  
日, 岡山市, 岡山県,

⑭増田啓太郎、山座孝義、馬蘭、 星野慶  
弘、樋口勝規、久木田敏夫, 歯周炎患者由  
来歯周靭帯幹細胞の免疫調節能に対するエ  
リスロポイエチンの影響, 第55回歯科基礎  
医学会総会, ポスター発表, 2013年9月20  
日~2013年9月22日, 岡山市, 岡山県,

⑮張旌旗、高橋良、久木田明子、成松加奈  
子、上原範久、山座孝義、城戸瑞穂、久木  
田敏夫, 膜ナノチューブを介する破骨細胞  
前駆細胞間融合の走査電顕的解析, 第55回  
歯科基礎医学会総会, ポスター発表, 2013  
年9月20日~2013年9月22日, 岡山市, 岡山  
県,

⑯Takayoshi Yamaza, Dental stem cell-based  
translational medicine. Kyudai Oral Bioscience  
2014 -8<sup>th</sup> International Symposium, 招待講  
演, 2014年2月28日, 福岡市, 福岡県,

⑰山座孝義, 歯髄幹細胞の特性と再生医療へ  
の応用, 第13回日本再生医療学会総会シン  
ポジウム, 招待講演, 2014年3月4日~2014  
年3月6日, 京都市, 京都府,

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山座 孝義 (YAMAZA, Takayoshi)  
九州大学 大学院歯学研究院・講師  
研究者番号: 80304814

### (2)研究分担者

山座 治義 (YAMAZA, Haruyoshi)  
九州大学 大学院歯学研究院・講師  
研究者番号: 30336151

### (3)連携研究者

なし